

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **07145148 A**(43) Date of publication of application: **06 . 06 . 95**

(51) Int. Cl

C07D209/10
C07D209/60
C07D263/56
C07D263/62
C07D277/84
C09B 23/00
G01N 21/35
G01N 21/64
G01N 21/78

(21) Application number: **04141469**(22) Date of filing: **02 . 06 . 92**(71) Applicant: **BIO SENSOR KENKYUSHO:KK**

(72) Inventor: **ISHIGURO NORIHIKO**
KITAYAMA RYUICHI
KAWAGUCHI SEIJI
HASHIMOTO YOSHIMI

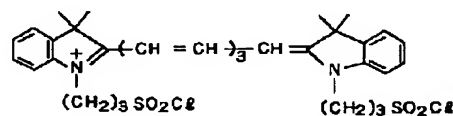
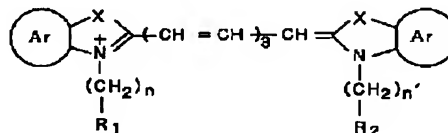
(54) **POLYMETHINE-BASED COMPOUND AND
 MEASURING METHOD USING THE SAME**

COPYRIGHT: (C)1995,JPO

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a polymethine-based compound applicable for measuring of an amino group-containing substance and analysis of an organism specimen without pretreatment, having high detection sensitivity, and extremely useful for quantitative analysis.

CONSTITUTION: A polymethine-based compound of formula I [(n) and (n') and 1-18 natural numbers; R₁ is H, sulfonic acid, N-succinimidylcarbonate or sulfonyl chloride; R₂ is N-succinimidyl carbonate, a halogen, isothiocyanate, sulfonyl chloride or aldehyde; Ar is a (substituted)phenyl, α-naphthyl or β-naphthyl; X is O, S or dimethylmethine) such as a compound of formula II. The compound of formula I, for example, is obtained by using succinimidylesterifying or halogenating the carboxyl, sulfonic or hydroxyl group of a polymethine-based compound as a raw material. A near-infrared light exciting fluorescent probe reagent composed of the compound is reacted with an amino group-containing substance and absorption or fluorescence of the near-infrared part of the reactional product is measured.



II

(11)特許出願公開番号

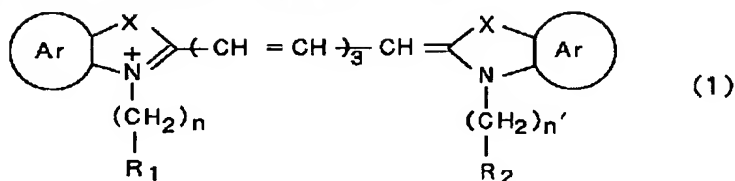
(式中n, n' はそれぞれ1~18の自然数、R₁は水素、スルホン酸基、N-スクシニミジルカルボネート

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記一般式 (1) で示されることを特徴 *

* とする、ポリメチン系化合物

【化 1】



(式中 n , n' はそれぞれ 1~18 の自然数、 R_1 は水素、スルホン酸基、N-スクシイミジルカルボネート基、スルホニルクロリド基のいずれかを表す。 R_2 は N-スクシイミジルカルボネート基、ハロゲン基、イソチオシアネート基、スルフォニルクロリド基、アルデヒド基のいずれかを表す。 Ar は、置換していてもよいフェニル基、 α -ナフチル基、 β -ナフチル基のいずれかを表す。 X は、酸素、イオウ、ジメチルメチレン基のいずれかを表す。)

【請求項 2】 請求項 1 に記載のポリメチン系化合物からなることを特徴とする、近赤外光励起蛍光プローブ試薬。

【請求項 3】 請求項 2 に記載の試薬をアミノ基を有する物質と反応させ、反応生成物の近赤外部に於ける吸収または蛍光を測定することを特徴とする、アミノ基含有物質の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はアミノ基を有する物質の高感度測定に有用な、ポリメチン系化合物およびそれを用いた測定方法である。

【0002】

【従来の技術】 従来、HPLC によるアミノ基を有する物質の定量法は種々開発されている。例えば、未修飾化合物の吸光度測定による直接定量法があるが、物質各々の性質に依存し、一般的にその感度は低い。また間接吸光度検出法も種々の方法が知られている。その方法としては、以下に示す方法が知られている。

【0003】 a) 230~260 nm の吸光を測定するアミノ酸の銅錯体法 (S. Levine, et al., Anal. Chem., 57, 1830 (1985))。

b) 254 nm 付近に紫外吸収を持つイオン対、例えばナフタレン-2-オクタンスルホン酸ナトリウム、1-フェニル-2-ピコリニウムなどを用い、HPLC により分離測定する方法 (M. Denker, et al., J. Chromatogr., 218, 31 (1981))。

【0004】 しかし、これらの方法もその感度は低い。

【0005】 ポストカラム法による吸光検出法としては、nmol 程度の感度を有するニンヒドリン法 (波多野博行, “アミノ酸自動分析法”, 化学同人, p 79

(1964)) 及び、PITC 法 (H. -Su, P. -

H. Lai, J. Chromatogr. 368, 215 (1986)) がある。一方蛍光検出法としては、オルトフタルアルデヒドを使用する OPA 法 (M. Roth, Anal. Chem., 43, 880 (1971))、フルオレッサミン法 (A. G. Georgiadis, et al., Ana. Biochem., 56, 121 (1973)、及び NBD 法 (Y. Watanabe, et al., Anal. Chem., 55, 1786 (1983)) などが知られている。これらの方法により、高感度分析への試みがなされている。

【0006】 プレカラム法においては紫外蛍光を有する多くの紫外蛍光プローブが知られている。例えば、FITC, NBD-Cl (F) (Y. Watanabe, et al., J. Chromatogr., 239, 723 (1982)、Fmoc (L. A. Carpino, et al., J. Org. Chem., 37, 3404 (1972)、及び DNS-Cl (Y. Tapuhi, et al., Anal. Biochem., 115, 123 (1981)) などが知られており、fmol 程度の感度を有する高感度測定も可能になりつつある。

【0007】

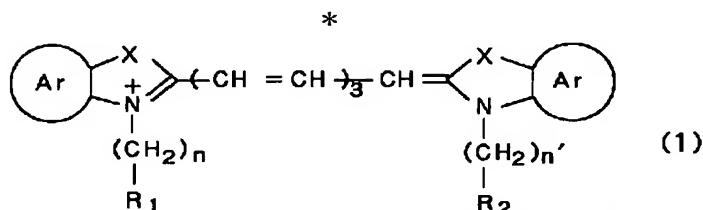
【発明が解決しようとする課題】 上述したように、アミノ基を有する物質の高感度分析が HPLC 法により達成されつつあるが、まだ多くの問題点を有している。その一つは、バックグラウンドに関する問題である。つまり実際の試料の分析に於いて、紫外部に吸収を持つ種々の妨害成分に由来する夾雑ピークの為に感度が低下し、同定が困難になることが多い。この為に、標準物質の定量で得られた感度が達成されないことが多い。特に生体試料などの場合には、この問題点を回避するために複雑な前処理が必要となる。

【0008】 また通常の吸光度及び蛍光測定法においても、バックグラウンドの上昇のため、同様の感度の低下が起こる。また蛍光分析法において高感度を追及する場合には、その検出器として、水冷アルゴンイオンレーザー、ヘリウム-カドニウムレーザーなどの大型かつ高価な励起光源が蛍光検出器に必要となるため、実用的な分析法でなくなる傾向があった。

【0009】 このような問題点を解決するために、種々の方法が検討されてきた。例えば化学発光法、時間分解法、近赤外部蛍光色素法などがあげられる。今坂らによって検討された近赤外励起蛍光色素法は、夾雑成分の吸

収のバックグラウンドを回避でき、また高感度化するために使用する半導体レーザーは非常に小型かつ安価である (Imasaka, T., Anal. Chem., 62, 363 (1990))。しかしながら、化合物と反応する活性部分を有する近赤外励起蛍光色素がこれまで得られていなかったため、本法の測定適用範囲は限られていた。

【 0 0 1 0 】



【0013】(式中 n , n' はそれぞれ1~18の自然数、 R_1 は水素、スルホン酸基、 N -スクシイミジルカルボネート基、スルホニルクロリド基のいずれかを表す。 R_2 は N -スクシイミジルカルボネート基、ハロゲン基、イソチオシアネート基、スルフォニルクロリド基、アルデヒド基のいずれかを表す。 Ar は、置換していてもよいフェニル基、 α -ナフチル基、 β -ナフチル基のいずれかを表す。 X は、酸素、イオウ、ジメチルメチレン基のいずれかを表す。)にある。

【0014】また本発明は、上記ポリメチン系化合物からなる近赤外光励起蛍光プローブ試薬を提供することをもう一つの特徴とする。

【0015】またこの試薬をアミノ基を有する物質と反応させ、反応生成物の近赤外部に於ける吸収または蛍光を測定することでアミノ基含有物質を測定する方法を更に他の特徴とする。

【0016】以下本発明をさらに詳細に説明する。

【0017】本発明のポリメチン化合物は上記一般式

(1) で示される。中でも n, n' は、大きすぎると A^*

＊【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、本発明に到達した。

【００１１】すなわち本発明の特徴は、下記一般式

(1) で示されるポリメチン系化合物

【 0 0 1 2 】

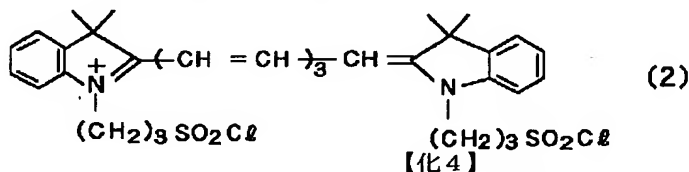
【化2】

※ミノ基を有する物質との反応性が劣るため、2～5が好ましい。R₁はH、スルホン酸基などアミノ基との反応性がない基が好ましい。アミノ基との反応性を有する基では、R₁およびR₂とアミノ基との反応物、R₁またはR₂とアミノ基との反応物、さらに未反応物が混在する恐れがあり、定量分析などにおいて取扱いが煩わしくなるからである。一方R₂は、アミノ基との反応性を有するもので、特にN-スクシイミジルカルボネート基、イソチオシアネート基が好ましい。これらは、水の存在する反応系においても分解しにくいからである。またArは置換していてもよいα-ナフチル基、Xはイオウ、ジメチルメチレン基であると、励起波長が長波長側にシフトするので好ましい。

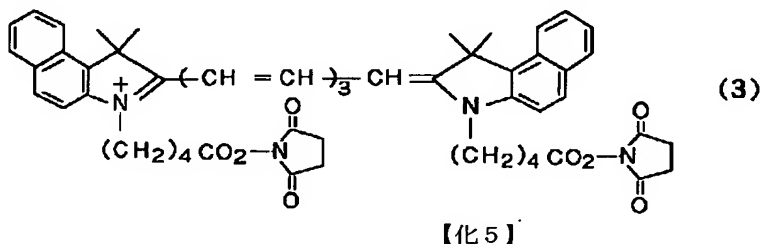
【0018】以上のような化合物の一例として、例えば以下に示す式(2)～(6)で示される化合物などがあげられる。

【 0 0 1 9 】

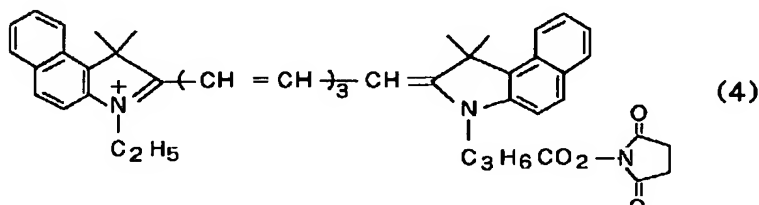
【化3】



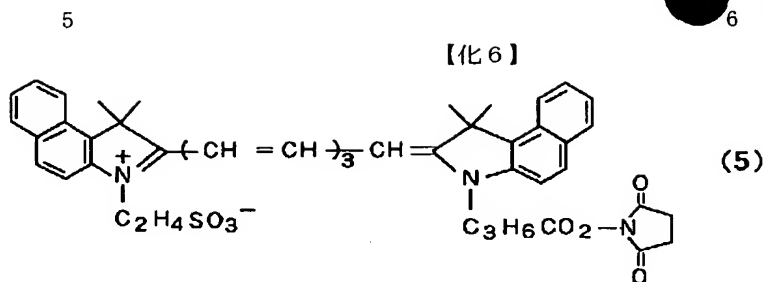
【0020】



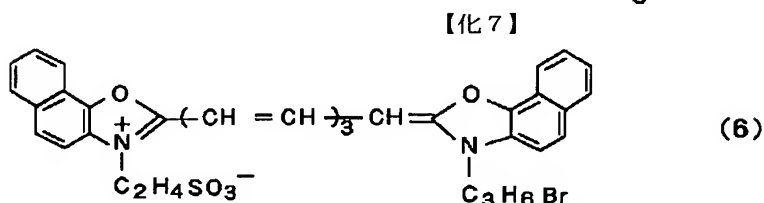
【 0 0 2 1 】



【0022】



【0023】

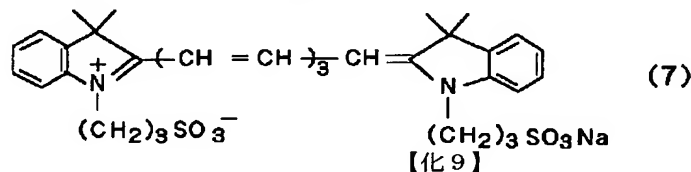


【0024】これら一般式(1)で示されるポリメチン系化合物は、公知のポリメチン系色素から製造することができる。具体的には上記式(2)~(6)の化合物は、それぞれ以下に示す式(7)~(11)のポリメチン系色素を原料とし、そのカルボキシル基、スルホン酸*

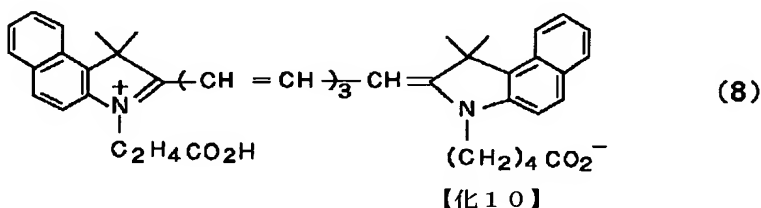
*基または水酸基をスクシイミジルエステル化又はハロゲン化することにより誘導することができる。

【0025】

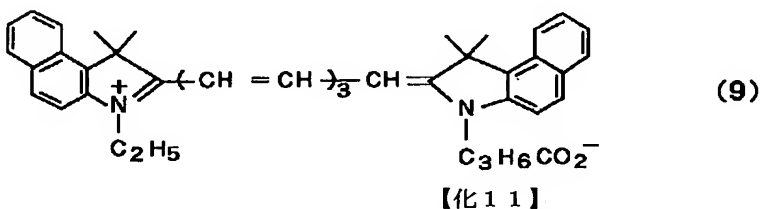
【化8】



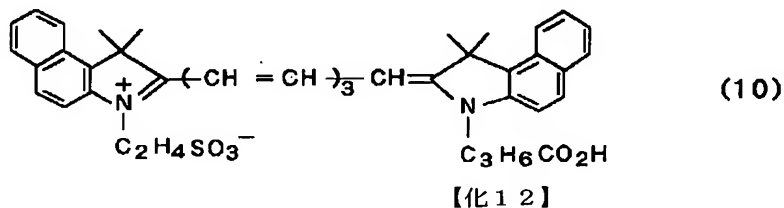
【0026】



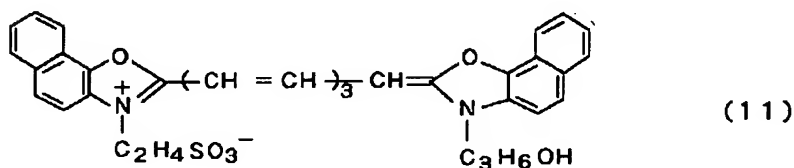
【0027】



【0028】



【0029】



【0030】一例を上げると、ポリメチン系色素のカルボキシル基のスクシイミジルエステル化は、ポリメチン系色素を無水アセトニトリルに溶解後、カルボキシル基に対し1.2等量のN,N'-ジスクシイミジルカルボ

ネートを室温で加え、そのまま1時間攪拌する。反応混合物を減圧濃縮後クロロホルムに溶解し、有機層を希塩酸水溶液で洗浄する。有機層を濃縮しヘキサンを加え、析出した紺色結晶を濾別することで、一般式(1)で示

されるポリメチン系化合物が得られる。原料となるポリメチン系色素の中で、式(10)の化合物のようなモノスルホン酸-モノカルボン酸ポリメチン色素が、種々の有機溶媒への溶解性が高くさらに水溶性も高いため、これをもとに一般式(1)で示されるポリメチン系化合物を製造することが好ましい。

【0031】一般式(1)のポリメチン系化合物は、近赤外光励起蛍光プローブ試薬として用いることができ、これをアミノ基を有する物質と反応させ、反応生成物の近赤外部における吸収又は蛍光を測定することで、アミノ基含有物質を測定することができる。即ち、一般式(1)で示されるポリメチン系化合物のN-スクシイミジルカルボネート基、ハロゲン基、イソチオシアネート基、スルフォニルクロリド基またはアルデヒド基と、測定対象のアミノ基とを反応させ、生成物質の近赤外部における吸収又は蛍光を測定すればよい。

【0032】このときの反応条件には限定はなく、室温でポリメチン系化合物とアミノ基含有物質とを混合すればよい。ポリメチン系化合物は、水の存在下で僅かずつではあるが分解していくため、ジメチルホルムアミドなど有機溶媒を用いるとよい。ただし有機溶媒だけではアミノ基含有物質が溶解しない場合があるため、水-有機溶媒の混合溶媒中で反応を行うとよい。好ましくは、混合溶媒における有機溶媒が60~95%、さらに好ましくは70~90%である。

【0033】ポリメチン系化合物の使用量については、少ないと反応が遅く、多すぎても無駄になるだけなので、反応する1級アミノ基に対しては2等量、2級アミノ基では4等量あれば充分である。ポリメチン系化合物とアミノ基との反応は非常に速く、約5分でほぼ反応が終了する。アミノ基含有物質の濃度に依存して反応が直線的に進行するので、定量分析に利用することができる。

【0034】測定対象のアミノ基含有物質としては特に限定はなく、例えば、アミノ酸やその混合物、尿や血漿など夾雑物質の多量に含まれている体液中のアミノ酸、ペプチド、タンパクなどの生体高分子が、特別な前処理なしに分離定量することができる。

【0035】アミノ基含有物質とポリメチン系化合物の反応生成物の検出には、近赤外部における吸収または蛍光を測定すればよい。これらの測定には、通常使用されている装置を用いればよい。本発明のポリメチン系化合物を用いた場合の検出感度は、吸光度の測定に於いては、数10 pmolまで検出可能であり、さらに近赤外励起半導体レーザー蛍光検出器を用いた場合には、出力12mwに於いて、数100 amolという超高感度な測定が可能である。

【0036】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるもの

ではない。

【0037】(実施例1)

N-スクシイミジル化ポリメチン系化合物の合成

1-1

式(10)で示されるモノスルホン酸-モノカルボン酸置換ポリメチン(MW=685)100mg(0.15mmol)をアセトニトリル20mlに溶解後、N,N'-ジスクシイミジルカルボネート960mg(0.44mmol)を室温に加え、そのまま室温下1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、クロロホルム300mlに溶解後、0.1N-HCl水溶液で洗浄し、有機層を無水Na₂SO₄乾燥し、続いて約50mlに減圧濃縮した。濃縮液にn-ヘキサン200mlを加え析出した結晶を濾別・減圧乾燥し、式(5)の化合物を102mg得た(収率90%)。

【0038】

IR ν cm⁻¹: 1735 (スクシイミジル基)

NMR (DMSO-d₆) δ: 2.58 (s, COCH₂CH₂CO)

MS: 785 (M⁺)

1-2

式(8)で示されるジカルボン酸置換ポリメチン(MW=730)100mg(0.14mmol)をアセトニトリル50mlに溶解後、N,N'-ジスクシイミジルカルボネート923mg(0.42mmol)を室温に加え、そのまま室温下、1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、クロロホルム300mlに溶解後、0.1N-HCl水溶液で洗浄し、有機層を無水Na₂SO₄乾燥し、続いて約100mlに減圧濃縮した。濃縮液にn-ヘキサン200mlを加え析出した結晶を濾別・減圧乾燥し、式(3)の化合物を52mg得た(収率40%)。

【0039】

IR ν cm⁻¹: 1735 (スクシイミジル基)

NMR (DMSO-d₆) δ: 2.58 (s, COCH₂CH₂CO)

1-3

式(9)で示されるモノカルボン酸置換ポリメチン(MW=589)100mg(0.17mmol)をアセトニトリル100mlに溶解後、N,N'-ジスクシイミジルカルボネート1.12g(0.51mmol)を室温に加え、そのまま室温下1時間攪拌した。反応混合物を減圧濃縮し、クロロホルム300mlに溶解後、0.1N-HCl水溶液で洗浄し、有機層を無水Na₂SO₄乾燥し、続いて、約100mlに減圧濃縮した。濃縮液にn-ヘキサン200mlを加え析出した結晶を濾別・減圧乾燥し、式(4)の化合物を78mg得た(収率70%)。

【0040】

IR ν cm⁻¹: 1735 (スクシイミジル基)

NMR (DMSO-d₆) δ: 2.58 (s, COCH₂CH₂CO)

(実施例 2)

アミノ酸との反応

2-1

グリシン 0.01g (0.13mmol) 水溶液 200μl に 5mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) 200μl を加え、さらにジメチルホルムアミド 750μl を加えた後、式 (5) で示されるスルホン酸置換ポリメチン-N-スクシニミジルカルボネート 366mg (0.39mmol) の DMF 溶液 800μl を室温で加え、そのまま 30 分撹拌した。反応混合物を HPLC (TSK gel ODS 80Tm 分取用) により精製し、グリシン-ポリメチン誘導体 80mg を得た (収率 84%)。

【0041】IR ν_{cm⁻¹}: 1765 (COOH), 1680 (CONH)

NMR (DMSO-d₆) δ: 3.85 (NH-CH₂COOH)

MS: 745 (M⁺)

2-2

2-1 と同様にして、ただしセリンと式 (5) の化合物とを等量用いて反応を行い、このとき反応溶媒中の DMF 濃度を変化させて、反応収率に及ぼす影響を調べた。結果を図 1 に示す。図中、○はセリンと前記式 (5) の化合物との反応収率を、●は前記式 (5) の化合物の加水分解物の収率を表す。図からも明らかなように、DMF 濃度が高いほど、反応収率が高く加水分解物が少ないことがわかる。

【0042】2-3

2-1 と同様にして、ただしアミノ酸としてセリン又はプロリンを用いて、反応に用いるポリメチン系化合物の量を変化させて反応収率に及ぼす影響を調べた。結果を図 2 に示す。図中○はプロリンを、●はセリンを用いたときの反応収率を表す。図からも明らかなように、プロリンに対しては 4 等量以上、セリンに対しては 2 等量以上のポリメチン系化合物を用いれば、反応は平衡に達する。これは、それぞれのアミノ基の 1 級と 2 級の違いによるものと考えられる。

【0043】2-4

2-1 と同様にして、ただしアミノ酸としてセリンを用い、式 (5) の化合物を 3 等量反応させたときの、反応時間と収率の関係を調べた。結果を図 3 に示す。図からも明らかなように、反応は約 5 分で十分に進行しており、反応速度が非常に速いことが分かる。

【0044】2-5

2-1 と同様にして、ただしアミノ酸として各種濃度のセリンを用いて反応させたときの、セリン濃度と HPLC のピーク面積との関係を調べた。結果を図 4 に示す。図からも明らかなように、セリン濃度と HPLC のピーク面積とは直線関係にあり、本反応は定量分析に応用で

きることを示された。

【0045】(実施例 3)

アミノ酸混合物との反応および分析

アミノ酸混合物 (Gly, Ala, Val, Leu, Ileu, Asp, Glu, Phe, Trp, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Met、各 10μg) 10μl に、5mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) 200μl, DMF 300μl を加え、式 (5) の化合物の DMF 溶液 (0.8mg/ml) 500μl を加え、室温で 30 分撹拌した。反応混合物 20μl を HPLC にインジェクションし、反応の進行を確認した。

【0046】分離条件は以下の通りである。

【0047】カラム (TSK gel ODS 80Tm 4.6mm×15cm)

移動相 (a) 5mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) - 40% アセトニトリル

b) 5mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) - 60% アセトニトリル

a) から b) への 25 分リニアグラジエント

流速 (1.0ml/min.),

検出器 (東ソー製、UV8010 700nm)

図 5 にそのクロマトグラムを示す。図中、それぞれ 1: His, 2: Arg, 3: Ser, 4: Asp, Glu, 5: Thr, 6: Gly, 7: Ala, 8: Met, Val, 9: Ile, Leu, 10: Trp, 11: Phe, 12: Lys の反応生成物である。図からも明らかなように、アミノ酸の一斉分析が可能で、低バックグラウンドで高感度な分析が可能であった。

【0048】(実施例 4)

血漿の分析

血漿 0.5ml に DMF 1.5ml を加え、析出した沈殿物を超遠心にかけて (2000pmr, 10 分)、その上澄液 10μl に 5mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) 200μl, DMF 300μl を加え、さらに式 (5) の化合物の DMF 溶液 (0.8mg/ml) 500μl を加え、室温 30 分撹拌した。反応混合物 20μl を HPLC にインジェクションし、反応の進行を確認した。

【0049】分離条件は以下の通りである。

【0050】カラム (TSK gel ODS 80Tm 4.6mm×15cm)

移動相 (a) 5mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) - 40% アセトニトリル

b) 5mM リン酸緩衝液 (pH 2.5) - 60% アセトニトリル

a) から b) への 25 分リニアグラジエント

流速 (1.0ml/min.),

図 6 にそのクロマトグラムを示す。図からも明らかなように、多量の夾雑物質が存在する血漿においても、Gly, Ala, Val などのアミノ酸の同時分析が可能で、低バックグラウンドで高感度な分析が可能であった。

10

20

30

40

50

【0051】（実施例5）

尿の分析

尿 0.5 ml に DMF 0.5 ml、5 mM ホウ酸緩衝液（pH 9.5）1.9 ml を加えた 20 倍希釈尿 200 μ l に、DMF 300 μ l、式（5）の化合物の DMF 溶液（0.8 mg/ml）500 μ l を加え、室温で 30 分撹拌した。反応混合物 20 μ l を HPLC にインジェクションし、反応の進行を確認した。

【0052】分離条件以下の通りである。

【0053】カラム（TSK gel ODS 80 Tm 4.6 mm \times 15 cm）

移動相（a）5 mM リン酸緩衝液（pH 2.5）- 40 % アセトニトリル

b）5 mM リン酸緩衝液（pH 2.5）- 60 % アセトニトリル

a）から b）への 25 分リニアグラジエント

流速（1.0 ml/min.），

検出器（東ソー製、UW8010 700 nm）

図 7 にそのクロマトグラムを示す。図から明らかなように、多量の夾雑物質が存在する尿においても、Thr, Gly, Ala などのアミノ酸の同時分析が可能で、低バックグラウンドで高感度な分析が可能であった。

【0054】（実施例6）

生体高分子との反応

生体高分子としてウシ血清アルブミン 1 mg 水溶液 200 μ l に 5 mM ホウ酸緩衝液（pH 9.5）200 μ l を加え、さらにジメチルホルムアミド 300 μ l を加えた後、33 μ g の式（5）の化合物の DMF 溶液（300 μ l）を室温で加え、そのまま 30 分撹拌した。反応混合物を直接 HPLC 分析することにより、反応の進行を確認した。

【0055】分離条件は以下の通りである。

【0056】カラム（TSK gel G3000 SW_h）

移動相（50 mM リン酸緩衝液（pH 6.8）：CH₃CN = 4 : 1）

流速（1.0 ml/min.），

検出器（東ソー製、UW8010 700 nm）

図 8 にそのクロマトグラムを示す。図中、矢印の位置にウシ血清アルブミンの反応生成物が検出された。図から明らかなように、ウシ血清アルブミンなどの生体高分子においても分析が可能で、低バックグラウンドで高感度な分析が可能であった。

【0057】（実施例7）

*

* 検出限界

実施例 2-1 で得たグリシン-ポリメチン誘導体、および実施例 2-1 と同様にして得たセリン-ポリメチン誘導体、アラニン-ポリメチン誘導体を HPLC 分析し、半導体レーザー励起蛍光検出器（出力 12 mW）を用いて検出限界を算出した。分離条件は以下の通りである。

【0058】カラム（TSK gel ODS 80 Tm

4.6 mm \times 15 cm）

移動相（a）5 mM リン酸緩衝液（pH 2.5）- 55 % アセトニトリル 流速（1.0 ml/min.）、注入量 10 μ l

図 9 にその結果を示す。図中、○はセリン-ポリメチン誘導体、△はグリシン-ポリメチン誘導体、□はアラニン-ポリメチン誘導体を示す。図からも明らかなように、低バックグラウンドで高感度な分析が可能であり、さらに半導体レーザー励起蛍光検出器によって超高感度分析が可能となった。

【0059】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明のポリメチン系化合物はアミノ基を有する物質の測定に利用できる。また特別な前処理なしに生体試料の分析に応用でき、高い検出感度を持ち、定量分析にも極めて有効である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】実施例 2-2 における溶媒組成と収率との関係を示す図である。

【図 2】実施例 2-3 におけるポリメチン系化合物量と反応収率との関係を示す図である。

【図 3】実施例 2-4 における反応時間と HPLC のピーク面積との関係を示す図である。

【図 4】実施例 2-5 における試料濃度と HPLC のピーク面積との関係を示す図である。

【図 5】実施例 3 におけるアミノ酸混合物の分析のクロマトグラムを示す図である。

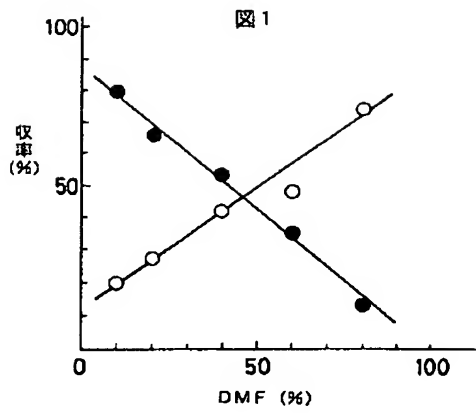
【図 6】実施例 4 における血漿中のアミノ酸の分析のクロマトグラムを示す図である。

【図 7】実施例 5 における尿のアミノ酸の分析のクロマトグラムを示す図である。

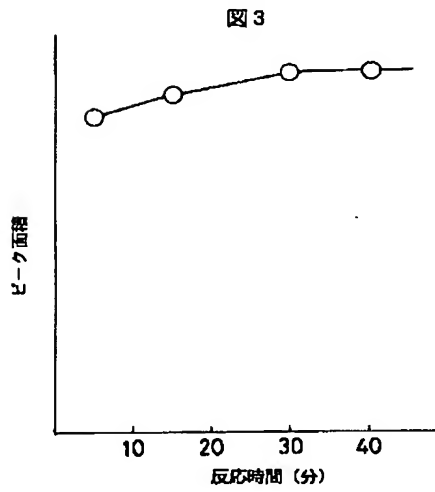
【図 8】実施例 6 におけるウシ血清アルブミンの分析のクロマトグラムを示す図である。

【図 9】実施例 7 における HPLC への負荷量とピーク高さを示す図である。

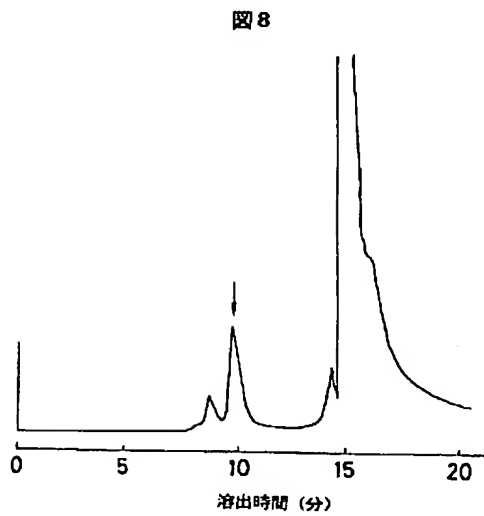
【図 1】



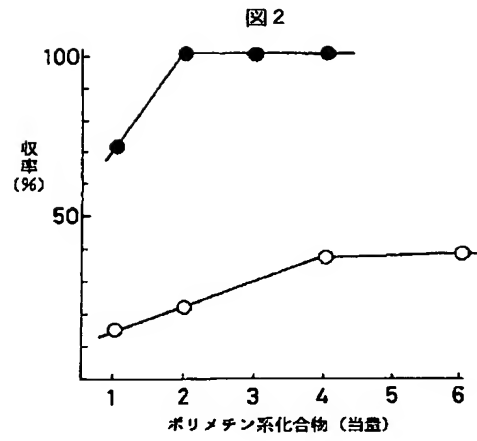
【図 3】



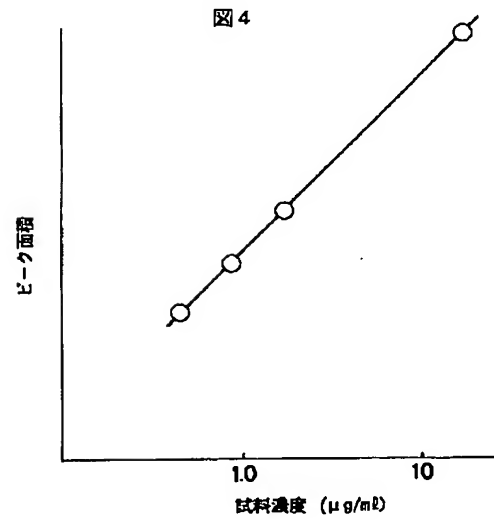
【図 8】



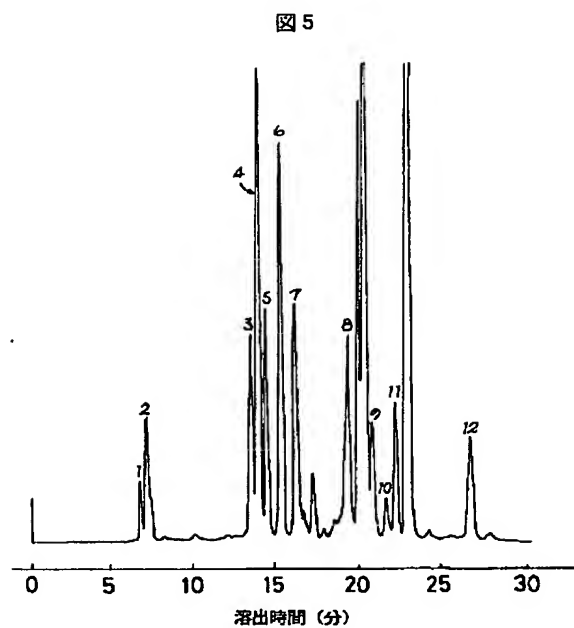
【図 2】



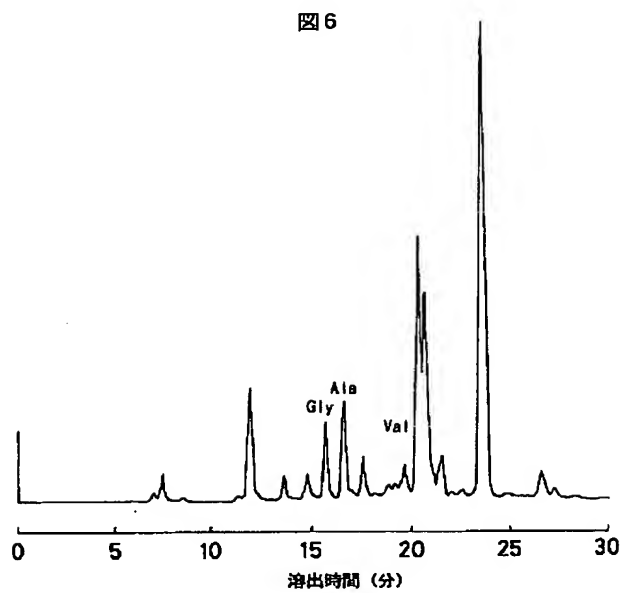
【図 4】



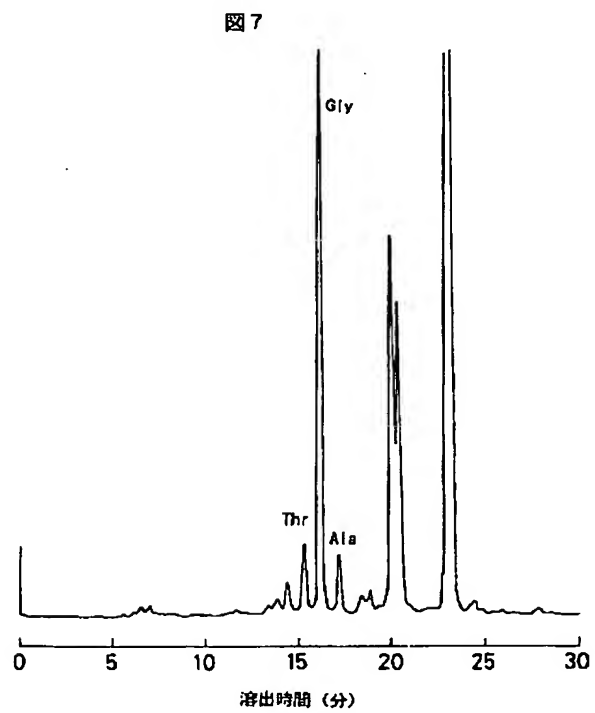
【図 5】



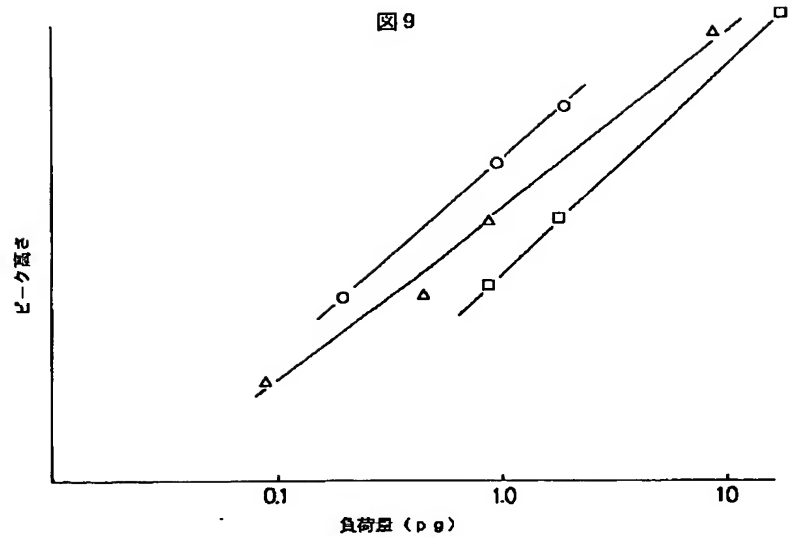
【図 6】



【図 7】



【図 9】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C O 9 B 23/00		L		
G O 1 N 21/35		Z 9118-2 J		
21/64				
		Z		
21/78				
(72) 発明者 川口 成治		(72) 発明者 橋本 佳巳		
神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式		神奈川県綾瀬市早川2743-1 東ソー株式		
会社東京研究センター科学計測事業部開発		会社東京研究センター科学計測事業部開発		
部内		部内		